Archive of SID

کاربرد حلالهای آلی، روشهای طیف سنجی مرئی – فرابنفش و HPLC در بهینه کردن استخراج و تعیین غلظت لیکوپن هندوانه

رحمان مهدی زاده*[۱]، محمدرضا فاضلی[۳]، طاهرنژاد ستاری[۲]، حسین توفیقی[۳]، حسین جمالی فر[۳] و ساکو میرزایی[۴]

[۱] بندرعباس، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرعباس، گروه زیست شناسی دریا

[۲] تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست شناسی

[۳] تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران ، دانشکده داروسازی، گروه کنترل دارو وغذا

[۴] سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، گروه بیوشیمی

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۲/۲۶ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۱/۶

چکیده

کاروتنوئیدها به طور وسیعی در داروسازی، مکملهای غذایی به عنوان رنگزاها و آنتی اکسیدانها مورد استفاده قرار می گیرند. لیکوپن کارتنوئیدی با زنجیره باز هیدروکربنی است که به وفور در سبزیجات و میوه ها وجود دارد و به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی در سیستمهای حیوانات و گیاهان شناخته می شود. این ترکیب به واسطه کاربردهای وسیع در صنایع دارویی، غذایی و بهداشتی مورد توجه زیادی قرار گرفته است. هدف از این تحقیق بهینه کردن استخراج و تعیین مقدار لیکوپن از هندوانه می باشد. برای رسیدن به این هدف نسبتهای متفاوت از حلالهایی نظیر هگزان، استون، اتانول، تتراهیدروفوران ودی ایزوپروپیل اتر برای استخراج بافتهای تازه له شده هندوانه مورد استفاده قرار گرفت. لیکوپن استخراج شده با استفاده از روشهای طیف سنجی مرئی – فرابنفش و HPLC تعیین مقدار شد. مناسب ترین نسبت حلالها برای استخراج لیکوپن از هندوانه، هگزان / استون / اتانول (V/V/V ۷:۷:۱۶) به دست آمد. غلظت لیکوپن به دست آمده با استفاده از روش HPLC، ۲/۵۹میلی گرم در لیتر وبا روش اسپکتر وفتومتری UV-Visible ۲/۳۹ میلی گرم در لیتر تعیین شد. نتایج حاصله نشان داد که با استفاده از یک نسبت مناسب از حلالها، مقادیر بالایی لیکوپن از هندوانه استخراج می گردد.

واژه های کلیدی: HPLC ، لیکوپن، هندوانه

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۹۱۷۷۶۱۲۹۲۵، پست الکترونیکی: Rahman.Biochem@gmail.com

مقدمه

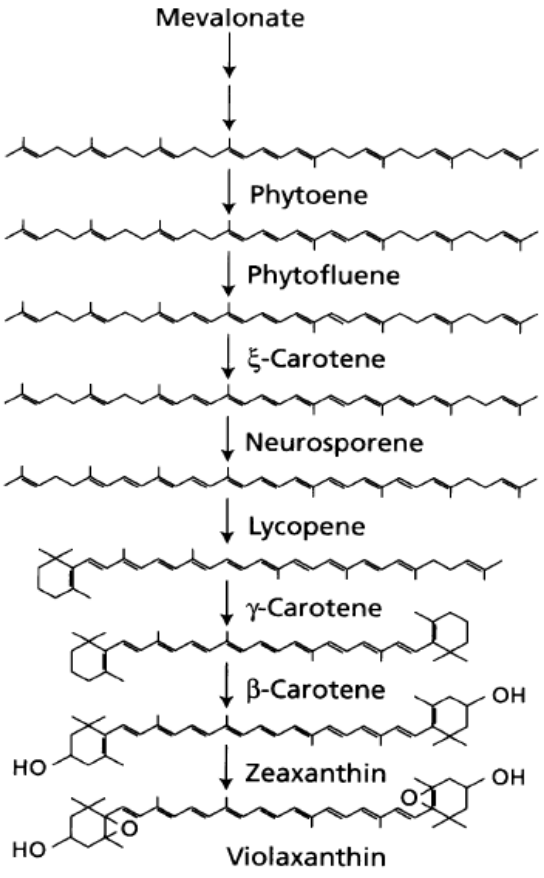
کارتنوئیدها ترکیباتی هستند که درتمامی گیاهان، جلبکها وسیانوباکتریها دیده می شوند. این ترکیبات اغلب در کلروپلاست ریشه، ساقه، برگ، گل ومیوه های گیاهان مختلف وجود دارد و از لحاظ ساختمانی به دو دسته تقسیم می شوند: ۱-کاروتنها که دارای گروههای هیدروکربنی می باشند و ۲-گزانتوفیلها که از مشتقات اکسیژنه می باشند. هر یک از این ترکیبات دارای ۴۰ کربن بوده که از به هم پیوستن ۸ واحد ایزوپرنوئید که خود شامل ۵ اتم کربن است، تشکیل شده اند. واحدهای ایزوپرنوئید توسط پیوندهای دو گانه به هم اتصال یافته وتفاوت آنها در درجه اشباع و وجود یا عدم وجود انتهای حلقوی می باشد (۶ و ۱۱). عملکرد کارتنوئیدها در جلبکها و گیاهان آلی به خوبی شناخته شده است. کارتنوئیدها عمل به دام انداختن نور در فتوسیستمها را بر

www.SID.ir

Archive of SID

عهده دارند (۱۲). تمامی کارتنوئیدها به دلیل داشتن خاصیت آنتی اکسیدانی در سلامتی انسانها نقش دارند ودرپیشگیری ازانواع سرطانها از قبیل سرطانهای پروستات، ریه و معده مؤثر می باشند (۱۳، ۱۸، ۱۹ و ۲۲). فعالیت آنتی اکسیدانی کارتنوئیدها به دلیل وجود فاکتورهای زیر است: تعداد پیوندهای دوگانه مزدوج، گروههای انتهایی(حلقه‌ای یا غیرحلقه‌ای) و گروههای فعال درون حلقه‌ها (۲۲). تنوع در ساختار کارتنوئیدها باعث تنوع درعملکرد آنها می‌شود. قدرت آنتی اکسیدانی ۳ نوع کارتنوئید مهم بدین صورت می‌باشد: لیکوپن>β-کاروتن>α-کاروتن (۳).

لیکوپن یک آنتی اکسیدان قوی بوده که در مسیر سنتز کارتنوئیدها ساخته می‌شود و در شکل ۱ نشان داده شده است (۹).



شکل ۱- مسیر سنتز کاروتنوئیدها

ساختار لیکوپن در سال ۱۹۳۰ توسط Karrer و همکارانش تعیین شد(۱۰ و ۱۵). لیکوپن یک مولکول بزرگ، دارای فرمول ساختاری $C_{۴۰}H_{۵۶}$، وزن مولکولی ۵۳۶ و به رنگ قرمز می‌باشد. این ترکیب باعث قرمزی رنگ بسیاری از میوه‌ها نظیرهندوانه، فلفل، گریپ‌فروت ، انبه، آلو و غیره می‌شود(۱۰ و ۱۵). و از لحاظ ساختمانی دارای ۱۳ پیوند دو گانه و ۲۰۴۸ ایزومر بوده که تنها تعدادی از این ایزومرها در گیاهان و حیوانات یافت می‌شوند، شکل ۲ ساختار شیمیایی این ترکیب را نشان می دهد (۲۶). لیکوپن نسبت به گرما و نور به شدت حساس بوده و به آسانی تخریب می‌شود. از این رو در زمان استخراج و خالص سازی باید از رسیدن نور به لیکوپن جلوگیری کرد و از دمای پایین استفاده شود (۴ ، ۲۱ و ۲۴). لیکوپن مانند سایر کارتنوئیدها در پیشگیری از چندین نوع سرطان و بیماریهای مهلک نظیر فیبروز کبدی و التهاب پوست موثر بوده و همچنین در مهار سرطانهایی مانند پروستات، التهاب روده ای و اپی تلیال نیز مفید می باشد، این یافته‌ها از مطالعات مربوط به تأثیر این ترکیب بر رادیکالهای آزاد حاصل شده است. لیکوپن نسبت به α- کاروتن وβ- کاروتن دارای اثر بیشتری در پیشگیری از تکثیر سلولهای سرطانی اپیتلیال می باشد (۲، ۷، ۹ و ۱۶). در برخی از تحقیقات برای تعیین مقدار لیکوپن موجود در هندوانه از روشهای غیر استخراجی مانند وابستگی رنگ هندوانه به میزان لیکوپن موجود در آن استفاده شده است(۱۰). اما این تکنیکها معتبر نبوده و برای جایگزینی با روشهای استخراج شیمیایی مناسب نیستند، روشهایی که برای تعیین مقدار لیکوپن از میوه ها و سبزیجات مورد استفاده قرار می گیرند باید دارای تشخیص سریع بوده و دسترسی به آنها آسان باشد (۵). هدف از این مطالعه دست یابی به بهترین روش استخراج لیکوپن از هندوانه می باشد که به این منظور از حلالهای آلی مختلف و از روشهای نظیر اسپکتروفتومتری و HPLC استفاده شد.

www.SID.ir

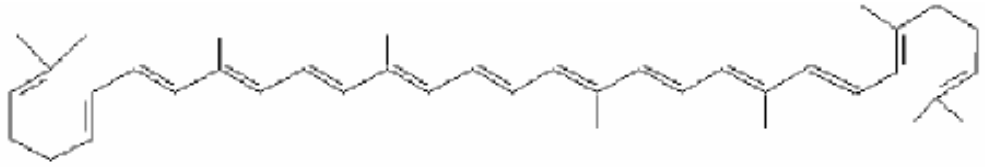
Archive of SID

جدول ۱ – حلالهای استفاده شده در استخراج لیکوپن

شماره	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
حلال	استون / اتانول / هگزان	دی ایزوپروپیل اتر / اتانول / هگزان	تتراهیدروفوران / اتانول / هگزان	هگزان خالص	اتانول خالص	تتراهیدروفوران خالص	دی ایزوپروپیل اتر خالص	استون خالص
حجم مورد استفاده	(۱۶:۷:۷ V/V/V)	(۱۶:۷:۷ V/V/V)	(۱۶:۷:۷ V/V/V)	۳۰ ml	۳۰ ml	۳۰ ml	۳۰ ml	۳۰ ml

مواد و روشها

۱- مواد مصرفی و دستگاه های مورد نیاز: لیکوپن بادرجه خلوص ۹۷ درصد از شرکت سیگما خریداری شد(Sigma Aldrich, USA). همه حلالهای مورد استفاده برای انجام HPLC از نوع HPLC grade بودند . حلالهای دیگر جهت استخراج لیکوپن که در جدول ۱ آورده شده اند، از نوع extra pure ساخت شرکت آلمانی Merck بودند. هندوانه از شاخه گیاهان، رده Magnoliopsida، راسته Violales، خانواده Cucurbitaceae، جنس *Citrullus* و گونه *Citrullu Lanatus Thunb*



شکل ۲- ساختار شیمیایی لیکوپن

می باشد. دستگاههایی که مورد استفاده قرار گرفته شد: HPLC مدل KNAUER ساخت کشور آلمان، اسپکتروفتومتر UV-VIS مدل Cecil 9200 ساخت کشور انگلیس، سانتریفیوژ یخچالی مدل MSE ساخت کشور انگلیس، یخچال آزمایش ساخت کشور ایران، ترازوهای دیجیتال مدل SHIMADZU وAND ساخت کشور ژاپن و دستگاه Minishaker مدل IKA ساخت کشور آمریکا.

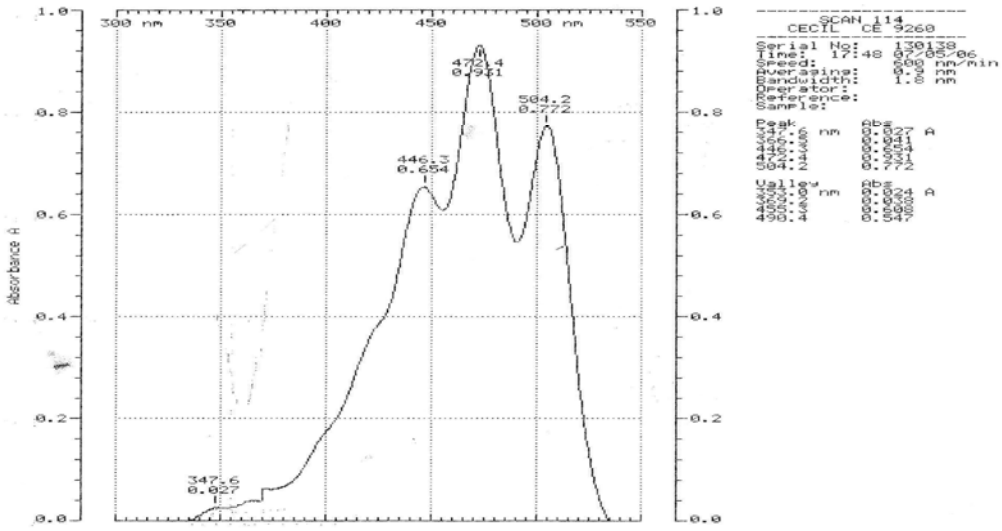
۲- تهیه و آماده سازی هندوانه: نمونه‌های هندوانه ای که مورد آزمایش قرار گرفتند، تا هنگام آنالیز در جای خنک و دور از نور نگه داشته شدند. یک گرم از قسمت خوراکی هندوانه که رنگ آن نیز قرمز بود، توسط ترازوی دقیق وزن شد و سپس درون فالکن ۵۰ میلی‌لیتری که اطراف آن با آلومینیوم پوشیده شده بود قرار داده شد و با همزن شیشه ای هموژن گردید (چون لیکوپن نسبت به نور و گرما حساس می‌باشد، بنابراین در هر مرحله از آزمایش باید از رسیدن نور و گرما به نمونه جلوگیری شود).

۳- استخراج لیکوپن توسط حلالهای آلی: از آنجایی که لیکوپن مادهٔ قابل حل در چربی است ، در آزمایشات انجام شده از حلالهای آلی نظیر اتانول، استون و هگزان استفاده شد (جدول ۱). در این مرحله مقدار ۳۰ میلی‌لیتر از یک نوع حلال (مثلاً هگزان) به درون فالکن حاوی نمونه هندوانه تهیه شده ریخته شد. سپس فالکن درون یخچال گذاشته شد تا هم گرمای آزمایشگاه به نمونه نرسد و هم زمان لازم برای حل شدن کاروتنوئیدهای موجود در داخل

www.SID.ir

Archive of SID

آن فراهم شود. در ادامه نمونه‌ها به مدت دو دقیقه توسط دستگاه ورتکس مخلوط شده و مجدداً درون یخچال گذاشته شدند. ورتکس کردن نمونه‌ها تا زمانی تکرار شد که رنگ هندوانه سفید شده و تمامی کارتنوئیدها از درون هندوانه خارج شدند. در مرحله بعدی نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریوفوژ یخچال دار با دور ۸۰۰۰ rpm (دور در دقیقه)، قرار داده شدند. مایع رویی را جدا کرده و مایع پایینی به‌همراه تفاله‌های هندوانه دور ریخته شدند.



نمودار۱- طیف اسپکتروسکوپی لیکوپن هندوانه در حلال هگزان،اتانول و استون(۱۶:۷:۷ V/V/V)

۴- تهیه لیکوپن استاندارد: محلولهای استوک استاندارد لیکوپن با غلظت ۱۰mg/L در حلال هگزان حل شد. از آنجا که محلولهای استوک نسبت به دما و نور حساس بوده آنها را در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد و دور از نور در فالکونی که اطراف آن با آلومینیوم پوشیده شده است نگهداری گردید، پس از آن محلولهای استوک لیکوپن با هگزان رقیق‌سازی شد تا مجموعه‌ای از استانداردهای لیکوپن حاصل شود. سپس استانداردهای لیکوپن رابه HPLC تزریق نموده و طیفها در دستگاه ذخیره شد. برای ذخیره طیف مناسب ازلیکوپن استاندارد، طول موج ۴۷۰nm انتخاب شد و برای آنالیز کمی لیکوپن موجود در هندوانه از منحنی کالیبراسیون استفاده گردید.

۵- شناسایی و تعیین مقدار لیکوپن توسط HPLC : ستون HPLC مورداستفاده برای آنالیز لیکوپن (4nm, × 250× ۴ mm+5 NCLIOSL Chorom Reverse- Phase پمپ دستگاه HPLCاز نوع K-۱۰۰۱ وآشکارساز آن (UV Detector) از نوع k-۲۶۰۰ انتخاب شد. جهت بررسی وآشکارسازی لیکوپن طول موج ۴۷۰nm انتخاب شد. شستشوبا استفاده از حلالهای استونیتریل و متانول به نسبت ۹۰:۱۰ و به روش ایزوکراتیک انجام گردید.

Flow rate یا سرعت جریان فاز متحرک، ml/min ۱ تعیین شد. غلظتهای متفاوت از لیکوپن استاندارد به دستگاه HPLC تزریق شد با استفاده از داده های حاصل، معادله رگرسیون خطی: (غلظت× ۳ /۲۴۶۲۹۰+۱ /۳۸۹۱۹ - = سطح زیر منحنی) و ضریب همبستگی(۰/۹۸۸ =r) تعیین گردید.

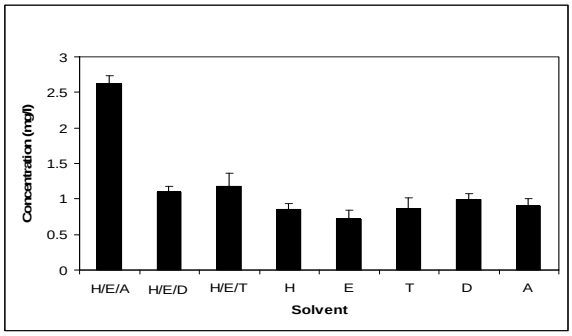
برای محاسبه غلظت لیکوپن مجهول پس از تزریق نمونه ها وتعیین سطح زیر منحنی در هر مورد غلظت به کمک معادله رگرسیون فوق تعیین گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

۶- تعیین غلظت با اسپکتروفتومتری UV-Visible : در این روش نیز به منظور تعیین غلظت لیکوپن موجود در هندوانه از رسم منحنی کالیبراسیون (Calibration curve) استفاده گردید. پنج استوک متفاوت از لیکوپن استاندارد به دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible داده شد، برای هر پنج نقطه، جذب و مقدار غلظت خاصی به دست آمد. با توجه به داده های حاصل، معادله رگرسیون خطی (غلظت ×۵۶۱ /۰+ ۰۲۶ /۰ - = جذب) و ضریب همبستگی (r= ۰/۹۹۹) تعیین گردید.

برای هر کدام از حلالهای مورد استفاده در جدول ۱، تعیین غلظت نمونه توسط معادله های به دست آمده با ۳ بار تکرار به هر دو روش اسپکتروفتومتری UV- Visible و HPLC به دست آمد.



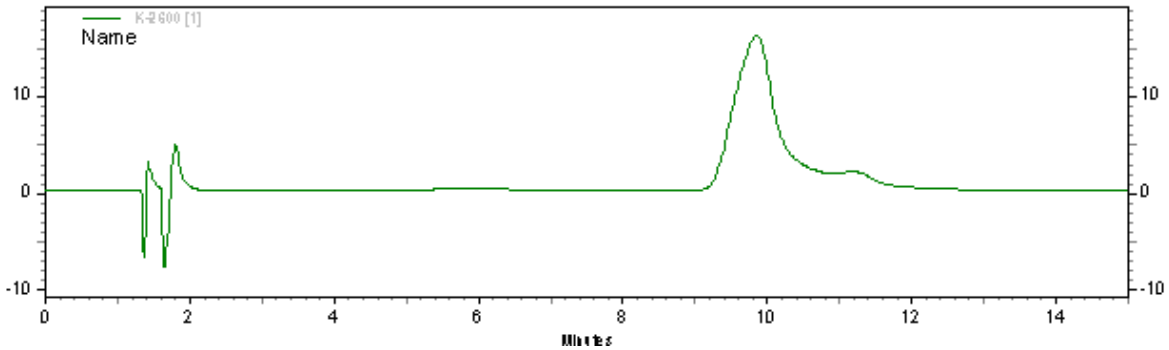
نمودار ۲- مقایسه و تعیین مقدار لیکوپن هندوانه توسط حلالهای مختلف به روش HPLC

نتایج

به منظور به دست آوردن غلظت لیکوپن موجود در هندوانه با روشهای اسپکتروفتومتری UV- Visible و HPLC، از حلالهای ذکر شده در جدول ۱ استفاده شد. نمودار ۱ طیف اسپکتروفتومتری لیکوپن را در حلالهای هگزان، اتانول و استون نشان می دهد. مقدار لیکوپن موجود در هندوانه توسط روش اسپکتروفتومتری UV-Visible درنمودار ۲ نشان داده شده است. در این روش غلظتهای به دست آمده بین ۰/۳۹ تا ۲/۳۲ میلی گرم در لیتر بود. طیف HPLCلیکوپن در حلالهای هگزان، استون و اتانول درنمودار ۳ نشان داده است. نمودار ۴ نتایج حاصل از تعیین مقدار لیکوپن در حلالهای مختلف به روش HPLC را نشان می دهد. همان طور که ملاحظه می شود غلظتهای به دست آمده بین۰/۴۸ تا ۲/۶۲ میلی گرم در لیتر به دست آمد.

بحث و نتیجه گیری

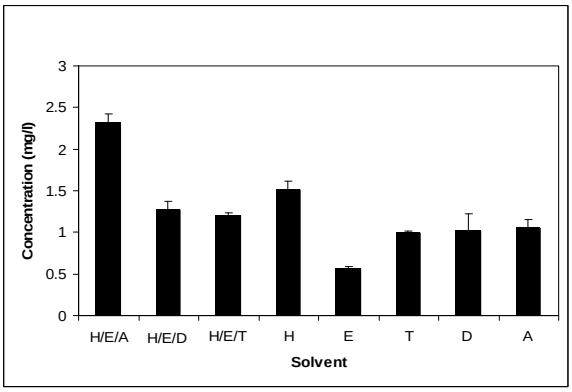
لیکوپن توسط روشهای اسپکتروفتومتری و کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) تعیین مقدار می شود. روش HPLC نسبت به اسپکتروفتومتری UV- Visible دارای حساسیت بالا و دقیق تر می باشد. حساسیت دستگاه HPLC برای تعیین مقدار لیکوپن ۰/۱ میکروگرم در لیترگزارش شده است (۳۰). در تحقیقات انجام شده دیگر بدین روش لیکوپن را تا حد ۰/۳۹۵ نانوگرم در لیتر شناسایی کرده اند (۱۲).



نمودار۳- :طیف HPLC لیکوپن هندوانه در حلالهای هگزان،اتانول و استون(۱۶:۷:۷ V/V/V)

www.SID.ir

Archive of SID



نمودا ر ۴- مقایسه استخراج و تعیین مقدار لیکوپن هندوانه توسط حلالهای مختلف به روش اسپکتروفتومتری

در هر دو روش نحوه عصاره گیری و استخراج برای به دست آوردن نتایج جدید و سرعت در استخراج مهم می باشد. لیکوپن ماده قابل حل در چربی است، بنابراین توسط حلال آلی نظیر اتانول، استون، هگزان، کلروفرم وغیره استخراج می شود (۱، ۸، ۱۳ و ۱۴). در مطالعات گزارش شده اغلب ترکیبی از حلالهای اتانول، استون، هگزان و متانول مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاصل از این تحقیقات نشان می دهد که استفاده از هگزان/استون/اتانول به نسبت (V/V/V ۲۵:۲۵:۵۰) از کارآیی بالایی در استخراج لیکوپن برخوردار می باشد. این نتایج از مطالعه بر روی طیف نمونه ها حاصل شد (۲۰).

در تحقیق انجام شده با استفاده از این دو روش مانند تحقیقات پیشین به دنبال حلالهای مناسب برای استخراج بیشتر لیکوپن بوده که استفاده از حلالهای ترکیبی نسبت به سایر حلالها نتایج بهتری را بیان می کند. هندوانه درون این حلالها در زمان ۲۰ دقیقه به طور کامل بی رنگ شد، در صورتی که در دیگر حلالهای به کاررفته زمان بیشتری مورد نیاز است و غلظت کاروتنوئیدهای به دست آمده پایین تر بود. این پدیده به این دلیل است که حلالهایی نظیر دی اتیل اتر و تترا هیدروفوران پراکسیداز می باشند وبا کارتنوئیدها واکنش می دهند. دلیل دوم اینکه پایداری لیکوپن استخراج شده توسط هگزان واستون یا هگزان و اتانول در مقایسه با استخراج توسط حلالهایی نظیر کلروفرم، متانول و دی کلرومتان خیلی بالاتر می باشد(۲۳ و ۲۵).

مقدار لیکوپن موجود در گونه های مختلف هندوانه بستگی به شرایط رشد ومحیط کشت وزراعت هندوانه دارد. برای مثال گونه های یکسان هندوانه که در محیطهای زراعی مختلفی کشت داده شده اند دارای نسبت لیکوپن متفاوتی بین ۱۲ تا ۵۲/۵ میکروگرم در گرم می باشند (۲۲ و ۲۷). لیکوپن ۸۷ تا ۹۹ درصد از کارتنوئیدهای هندوانه را تشکیل می دهد (۲۳). گزارشهای مختلفی راجع به مقدار لیکوپن هندوانه ارائه شده است. ازجمله ۱۲/۲ میکروگرم در گرم در برخی گونه ها و در گونه های بدون هسته و منحصر بفرد تا ۱۰۰ میکروگرم در گرم(۲۲ و ۲۷) ، ۶/۵ تا ۷/۳ میلی گرم در لیتر (۲۰)، ۵۷/۴ تا ۷۱/۲ میکرو گرم در گرم**(۲۲)**، ۴۵/۱ تا ۵۳/۲ میکرو گرم در گرم (۱۵) و ۴/۱ میلی گرم در ۱۰۰ گرم (۲۸).

در تحقیق انجام شده مناسب ترین حلال برای استخراج لیکوپن از هندوانه، هگزان / استون / اتانول به نسبت (V/V/V ۷:۷:۱۶) بود که مقدار ۲/۵۹ میلی گرم در لیتر را نشان می دهد، این نتایج از یافته های HPLC به دست آمد. مقادیر لیکوپن به دست آمده با هر دو روش بین ۰/۳۹ تا ۵۹/ ۲ میلی گرم در لیتر را نشان می دهدکه نمایان میزان لیکوپن بالا در هندوانه می باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1- Al-Wandawi, H.; Abul-Rahman, A.; Al-Shaikhly, K. (1985) Watermelon processing wastes as essential raw materials source. *J. Agric. Food Chem. 33*, 804-807

2- American Association for Cancer Research, Philadelphia, Apr. 1999

3- Anguelova T, Warthesen J. (2000) ; Lycopene stability in Watermelon Powders. *Food Chem.Toxicol.* 65(1):67-70

4- Barua AB, Furr HC. (1992) Extraction and analysis by HPLC of carotenoids in human serum. In: Methods in Enzymology, Vol 213. Academic Press, Inc., pp: 273-281

5- Choudhary R , (1991), rapid stimulation of lycopene concentration in watermelon and tomato sample by fiber optic visible spectroscopy, Jawaharlal Nehru Agricul University,Jabalpur, India

6- Cunningham FX, Sun MD, Chamovitz Z, Hirschberg D, Gantt E. (1994) structure and enzymatic function of lycopene cyclase from the cyanobacterium Synechococcus sp strain PCC7942. *Plant Cell*. 6(8):1107-1121

7- De Stefani E, Boffetta P, Deneo-Pellegrini H, Mendilaharsu M, Carzoglio JC, Ronco A, Olivera L.(1999) Dietary antioxidants and lung cancer risk: A case-control study Uruguay. *Nutr. & Cancer* 34(1):100-110

8- Dewanto, V.; Wu, X.; Adom, K. K.; Liu, R. H. (2002) Thermal processing enhances the nutritional value of tomato by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*,50, 3010-3014.

9- Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. (1989) Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Bichem. Biophys.* 274:532-538

10- D'Souza M., Singh S, and Ingle M. (1992). Lycopene concentration of Tomato fruit can be estimated from chromaticity values. *Hort. Sci.* 27 (5)465-466

11- Ellis GH, Hamner KC. (1943) The carotene content of tomatoes as influenced by various factors. *J. Nutrition.* 25:539-553

12- Gartner C, Stahl W, Sies H. (1997). Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *Am. J. Clin. Nutr*. 66:116-22

13- Hopkins WG. (1999a) Introduction to Plant Physiology. 2ed. John Wiley & Sons, Inc. New York. pp: 134-135

14- Hopkins WG. (1999b) Introduction to Plant Physiology 2ed. John Wiley & Sons, Inc. New York. pp :183-185

15- Khachik, F.; Goli, M. B.; Beecher, G. R.; Holden, J.; Lusby, W. R.; norio, M. D.; Barrera, M. R. (1992) Effect of food preparation on qualitative andquantitative distribution of major carotenoids constituents of Watermelones and several green vegetables. *J. Agric. Food Chem. 40*, 390-398.

16- Lin, C. H.; Chen, B. H. (2003) Determination of carotenoids in Tomato juice by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A 1012*, 103-109.

17- Mangels AR, Holden JM, Beecher GR, Forman MR, Lanza E. Carotenoid content of fruits and vegetables: An evaluation of analytic data. *J. American Dietetic Assoc.* 1993; 93:284-296

18- Michaud DS, Feskanich D, Rimm EB, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC .*(* 2000) Intake of specific carotenoids and risk of lung cancer in 2 prospective US cohorts. *Am. J. Clin. Nutr*72(4):990-997

19- Moden B, Chuckle H, Lubin F. A(1986) Note on the role of dietary retinol and carotene in human gastrointestinal cancer. *Int. J. Cancer.* 1981; 28:421

20- Olives A.I. Barba M, Camara H ,M.C.Sanchez M, M.Lopez Saenz de tejada. (2005) .Application of a UV–vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β-carotene in vegetables. Food Chem. 1032:1125-1132

21- Olson JCarotenoid, vitamin A and cancer. *J. Nutrition.* . 116:1127

22- Perkins-V, Collins Pair S.D, and Roberts W. (2001). Lycopene content differs among red-fleshed watermelon cultivars. *J. Sci. Food and Agr*. 81:983-987.

23- Scott KJ. (1992) Observations on some of the problems associated with the analysis of carotenoids in foods by HPLC. *Food Chem.* 45:357-364

24- Stahl W, Sies H. . (1996) Perspectives in biochemistry and biophysics. Lycopene: A

www.SID.ir

Archive of SID

biologically important carotenoid for humans? *Arch. Biochem. Biophys*336:1-9

25- Taungbodhitham, A. K.; Jones, G. P.; Wahlqvist, M. L.; Briggs, D. R. (1998) Evaluation of extraction method for the analysis of carotenoids in fruits and vegetables. *Food Chem.* 63, 577- 584.

26- Thurnham DI, Smith E, Flora PS. (1987) Plasma carotenes in the British Nutrition Survey (Abstract). *In:* Proc 8th Int Symp on Carotenoids. 1987; 4

27- Tomes ML. (1963). Temperature inhibition of carotene synthesis in tomato. *Botanical Gazette* 124:180-185

28- USDA-NASS. (2004). Agricultural StatisticsDatabase. Available at http://usda.mannlib.cornell.edu/reports/nassr/fruit/pvg-bb/2004/vege0404.pdf

29- van den Berg, H.; Faulks, R.; Fernando-Granado, H.; Hirschberg, J.; Olmedilla, B.; Sandmann, G.; Southon, S.; Stahl, W . *(*2000) The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *J. Sci. Food Agric80*, 880-912.

30- Zakaria M, Simpson K. (1979). Use of reversed-phase HPLC analysis for the determination of provitamin A carotenes in tomatoes. *J. Chrom*. 176:109-117

31- Zechmeister L. (1962) *Cis-trans* isomeric carotenoids, vitamins and arylpolyenes. Academic Press, New York.,pp:156-160

www.SID.ir

Archive of SID

The use of organic solvents, UV- visible spectrophotometry and HPLC methods in extraction and quantification of Lycopene from Watermelon

Mahdizadeh R., Fazeli M.R.[3], Nejadsatari T.[2] ,Tofighi H.[3] , Jamalifar H.[3] and Mirzai S.[4]

[1] **Marine Biology Dept., Islamic Azad University, Bandar abbas Branch, Bandar Abbas, Iran.**

[2] **Biology Dept., Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, I.R. of IRAN**

[3] **Drug and Food Control Dept., School of pharmacy and Pharmaceutical Sciences Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R. of IRAN**

[4]**Biochemistry Dept., Islamic Azad University, Sanandaj branch, Sanandaj, I.R. of IRAN**

Abstract

Carotenoids are unsaturated fatty acids composed of isopernoid units. Lycopene a carotenoid, with open-chain hydrocarbon exists in vegetables and fruits and recognized as a strong antioxidant in animal and plant systems. This compound has been received much attention for wide applications in pharmaceuticals, foods and health industries. The purpose of this study is to optimize extraction and quantification of Lycopene from Watermelon.Different ratio of solvents such as hexane, acetone, ethanol, tetrahydrofuran and as Di isopropyl ether were used to extract the freshly squeezed tissues of Watermelon. The extracted Lycopene was quantified using UV- visible spectrophotometry as well as HPLC methods. The best ratio of solvents for Lycopene extraction from Watermelon was found in hexane/ acetone/ethanol (16:7:7 V/V/V). Using this solvent , the amount of lycopene detected by HPLC 2.62 mg/l and by UV-visible spectrophotometry This was 2.32 mg/l. A proper ratios of the solvent, high quantify lycopene was extracted from Watermelon.

Keywords: HPLC, Lycopene, Watermelon.

www.SID.ir